

PCT/JPG3/11548

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

10.09.03

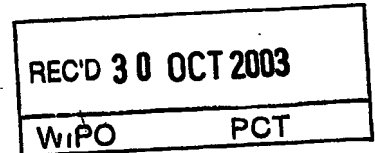
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 3 年 3 月 4 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 3 - 0 5 6 8 1 3
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 0 5 6 8 1 3]

出 願 人
Applicant(s): 山之内製薬株式会社

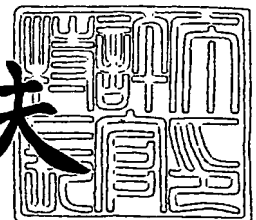


**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 3 年 1 0 月 2 0 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 0000003243

【提出日】 平成15年 3月 4日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12Q 1/00

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市御幸が丘 2 1 山之内製薬株式会社内

 【氏名】 大石 崇秀

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市御幸が丘 2 1 山之内製薬株式会社内

 【氏名】 小泉 智信

【特許出願人】

 【識別番号】 000006677

 【氏名又は名称】 山之内製薬株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100089200

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 長井 省三

 【電話番号】 03-5916-5111

【選任した代理人】

 【識別番号】 100109357

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 矢野 恵美子

 【電話番号】 03-5916-5111

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 005348

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

【物件名】

図面 1

【物件名】

要約書 1

【プルーフの要否】

要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 インスリン含量増加剤スクリーニング方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 (1) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列又は配列番号 4 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、あるいは、(2) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列又は配列番号 4 で表されるアミノ酸配列において、1～15 個のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、しかも、活性化されることにより、インスリン産生を促進する活性を示すポリペプチドである、インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤スクリーニングツール。

【請求項 2】 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列又は配列番号 4 で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、活性化されることにより、インスリン産生を促進する活性を示すポリペプチドである、インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤スクリーニングツール。

【請求項 3】 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列又は配列番号 4 で表されるアミノ酸配列との相同性が 80% 以上であるアミノ酸配列からなり、活性化されることにより、インスリン産生を促進する活性を示すポリペプチドである、インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤スクリーニングツール。

【請求項 4】 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列又は配列番号 4 で表されるアミノ酸配列で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドである、インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤スクリーニングツール。

【請求項 5】 請求項 1～4 のいずれか一項に記載のポリペプチドを発現している細胞である、インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤スクリーニングツール。

【請求項 6】 請求項 5 に記載の細胞、又はその細胞膜と、試験化合物とを接触させる工程、及び請求項 1～4 のいずれか一項に記載のポリペプチドが活性化されるか否かを分析する工程を含む、インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤スクリーニング方法。

【請求項 7】 請求項 5 に記載の細胞、又はその細胞膜と、試験化合物とを

接触させる工程、及び請求項 1～4 のいずれか一項に記載のポリペプチドが活性化されるか否かを分析する工程、並びに、製剤化工程を含む、インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加用医薬組成物の製造方法。

【請求項 8】 請求項 1～4 のいずれか一項に記載のポリペプチドを活性化する物質を有効成分として含む、インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、インスリン産生促進に基づくインスリン含量増加剤のスクリーニングツール及びスクリーニング方法、新規なインスリン含量増加剤に関する。

【0002】

【従来の技術】

「糖尿病」は、インスリン作用の不足による慢性高血糖を主徴とし、種々の特徴的な代謝異常を伴う疾患群であると定義され [「糖尿病」, 1999 年, 第 4 巻, 第 5 号, p. 385-404 (非特許文献 1)]、その成因によって、膵 β 細胞の破壊性病変によるインスリン欠乏を特徴とする「インスリン依存型 (1 型)」と、インスリン感受性の低下とインスリン分泌低下の両者を伴う「インスリン非依存型 (2 型)」に分類される。

【0003】

特に糖尿病患者の約 9 割を占める 2 型糖尿病においては、慢性的な高血糖により、膵 β 細胞の機能低下、すなわち、インスリン分泌能の低下及びインスリン含量の低下を引き起こすと理解されている [シー・ロナルド・カーン及びゴードン・シー・ウィアー (C. Ronald Kahn and Gordon C. Weir) 編, 金澤康德, 他 3 名訳, 「ジョスリン糖尿病学」, 医学書院エムワイダブリュー, 1995 年, p. 245-268 (非特許文献 2)]。今日の臨床においては、インスリン分泌低下が認められる糖尿病患者に対する治療薬の 1 つとして、スルホニルウレア (SU) 剤が用いられている。この薬剤は、インス

リンの生合成を促進することなく、すなわち、インスリン含量を増加させることなく、膵臓からのインスリン分泌を促進させることがわかっている。更に、この薬剤は、膵 β 細胞の機能障害、特にインスリン欠乏を引き起こしてしまうことが知られている [シー・ロナルド・カーン及びゴードン・シー・ウィアー (C. Ronald Kahn and Gordon C. Weir) 編, 金澤康德, 他3名訳, 「ジョスリン糖尿病学」, 医学書院エムワイダブリュー, 1995年, p: 505-525 (非特許文献3)]。従って、慢性的高血糖又はスルホニル尿素剤の使用などにより低下した膵機能を改善させる薬剤、特にインスリン産生を促進し、インスリン含量を増加させ、糖尿病を予防及び／又は治療する薬剤の開発が望まれている。

【0004】

膵 β 細胞のインスリン含量を増加させるためには、インスリン遺伝子の転写及び／又は翻訳の過程を増強させて、インスリン生合成を促進させることが必要と考えられる。インスリンの生合成を促進させるものとして、グルコースやcAMPが知られており、その作用メカニズムとして、転写の亢進及びmRNAの安定化によるインスリンmRNA量の増加が知られている [「ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (The Journal of Biological Chemistry)」, (米国), 1985年, 第260巻, p. 13585-13589 (非特許文献4); 「ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (The Journal of Biological Chemistry)」, (米国), 1985年, 第260巻, p. 13590-13594 (非特許文献5); 及び「ダイアビエティーズ (Diabetes)」, (米国), 1977年, 第26巻, p. 538-545 (非特許文献6)]。従って、インスリンmRNAを増加させる物質 (例えば、インスリンプロモーター活性を増強させる物質) は、インスリン含量を増加させる作用を有すると考えられている。

【0005】

インスリン分泌の制御に関与する分子として、つまり、インスリン分泌促進作用を有する分子として報告されているGタンパク質共役型受容体が存在する [国

際公開WO02/44362号パンフレット（特許文献1）」。しかし、「インスリン産生促進作用」及び「インスリン含量増加作用」についてはこれまで全く知られていない。また、インスリン含量を増加させる物質をスクリーニングするための適したアッセイ方法についても報告はない。

【0006】

国際公開WO00/50562号パンフレット（特許文献2）には、国際公開WO02/44362号パンフレットに開示されているヒト及びラット受容体と同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNA、及びそれがコードするポリペプチドが記載されており、アゴニスト及びアンタゴニストの用途として、同一の多数の疾患（糖尿病を含む）を列挙している。

欧州特許出願公開第1092727A号明細書（特許文献3）及び特開2001-186888号公報（特許文献4）には、前記ヒト受容体と同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNA、及びそれがコードする推定アミノ酸配列が記載されており、前記ポリペプチドを調節する物質の用途として、多数の疾患の治療を列挙し、糖尿病治療が好ましいと記載されている。

国際公開WO01/32864号パンフレット（特許文献5）、国際公開WO01/36473号パンフレット（特許文献6）、国際公開WO01/42288号パンフレット（特許文献7）、及び国際公開WO01/87929号パンフレット（特許文献8）には、前記ヒト受容体と同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNA、及びそれがコードする推定アミノ酸配列が記載されており、前記ポリペプチドを調節する物質の用途として、多数の疾患（糖尿病を含む）の治療を列挙している。

しかし、いずれにも、これらの受容体を活性化することによりインスリン産生を促進すること、及びこれらの受容体がインスリン産生促進剤又はインスリン含量増加剤のスクリーニングツールになることの開示も示唆もなく、これらの受容体を用いたインスリン産生促進剤又はインスリン含量増加剤のスクリーニング方法についても開示も示唆もない。

【0007】

【非特許文献1】

「糖尿病」, 1999年, 第42巻, 第5号, p. 385-404

【非特許文献2】

シー・ロナルド・カーン及びゴードン・シー・ウィアー (C. Ronald Kahn and Gordon C. Weir) 編, 金澤康徳, 他3名訳, 「ジョスリン糖尿病学」, 医学書院エムワイダブリュー, 1995年, p. 245-268

【非特許文献3】

シー・ロナルド・カーン及びゴードン・シー・ウィアー (C. Ronald Kahn and Gordon C. Weir) 編, 金澤康徳, 他3名訳, 「ジョスリン糖尿病学」, 医学書院エムワイダブリュー, 1995年, p. 505-525

【非特許文献4】

「ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (The Journal of Biological Chemistry)」, (米国), 1985年, 第260巻, p. 13585-13589

【非特許文献5】

「ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (The Journal of Biological Chemistry)」, (米国), 1985年, 第260巻, p. 13590-13594

【非特許文献6】

「ダイアビエティーズ (Diabetes)」, (米国), 1977年, 第26巻, p. 538-545

【特許文献1】

国際公開WO02/44362号パンフレット

【特許文献2】

国際公開WO00/50562号パンフレット

【特許文献3】

欧州特許出願公開第1092727A号明細書

【特許文献4】

特開 2001-186888 号公報

【特許文献 5】

国際公開 WO 01/32864 号パンフレット

【特許文献 6】

国際公開 WO 01/36473 号パンフレット

【特許文献 7】

国際公開 WO 01/42288 号パンフレット

【特許文献 8】

国際公開 WO 01/87929 号パンフレット

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、インスリン産生を促進することにより、インスリン含量を増加させ、糖尿病を予防及び／又は治療するために有用な物質のスクリーニングに役立つツール、スクリーニング法及び新規なインスリン含量増加剤を提供することにある。

【0009】

【課題を解決するための手段】

インスリンプロモーター遺伝子を活性化する物質の中には、例えば、細胞内でインスリンプロモーターに直接結合して活性化する因子を介するものや、細胞膜表面上にあるタンパク質〔例えば、Gタンパク質共役型受容体（GPCR）〕に直接作用して、その活性を制御することにより、インスリンプロモーター活性を増強させる物質が含まれる。インスリンプロモーター活性を上げるような薬剤のうち、細胞内で作用する物質は、細胞膜（更には核膜）を通過する必要があるが、細胞膜表面のタンパク質が標的である場合は、細胞膜の通過は必要ない。現在知られている薬の約半数以上が、細胞膜表面にあるタンパク質を標的としていることから、この種のタンパク質は医薬品の標的として魅力的であり、創薬上可能性の高い標的となり得ると考える。従って、細胞膜に存在するタンパク質で、インスリンプロモーター遺伝子の活性を制御することのできる分子（創薬標的分子）の発見は、インスリン含量を増加させるという糖尿病治療薬開発にとって非常

に重要であり、糖尿病の予防と治療に貢献するものと考えられる。本発明者は、鋭意研究の結果、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなる GPCR が活性化されることにより、インスリンプロモーター活性を上昇させ、インスリン産生促進が増加することを見出し、これに基づき、前記 GPCR を用いたインスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤のスクリーニング法を提供し、本発明を完成した。

【0010】

すなわち、本発明は、

[1] (1) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列又は配列番号 4 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、あるいは、(2) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列又は配列番号 4 で表されるアミノ酸配列において、1～15 個のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、しかも、活性化されることにより、インスリン産生を促進する活性を示すポリペプチドである、インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤スクリーニングツール；

[2] 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列又は配列番号 4 で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、活性化されることにより、インスリン産生を促進する活性を示すポリペプチドである、インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤スクリーニングツール；

[3] 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列又は配列番号 4 で表されるアミノ酸配列との相同性が 80% 以上であるアミノ酸配列からなり、活性化されることにより、インスリン産生を促進する活性を示すポリペプチドである、インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤スクリーニングツール；

[4] 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列又は配列番号 4 で表されるアミノ酸配列で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドである、インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤スクリーニングツール（以下、[1]～[4]に記載のインスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤スクリーニングツールを、総称して、ポリペプチド型スクリーニングツールと称する）；

[5] [1]～[4]に記載のポリペプチドを発現している細胞である、インス

リン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤スクリーニングツール（以下、細胞型スクリーニングツールと称する）；

〔6〕〔5〕に記載の細胞、又はその細胞膜と、試験化合物とを接触させる工程、及び〔1〕～〔4〕に記載のポリペプチドが活性化されるか否かを分析する工程を含む、インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤スクリーニング方法

〔7〕〔5〕に記載の細胞、又はその細胞膜と、試験化合物とを接触させる工程、及び請求項 1～4 のいずれか一項に記載のポリペプチドが活性化されるか否かを分析する工程、並びに、製剤化工程を含む、インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤医薬組成物の製造方法；並びに

〔8〕〔1〕～〔4〕のいずれか一項に記載のポリペプチドを活性化する物質を有効成分として含む、インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤。に関する。

【0011】

本明細書において、「スクリーニングツール」とは、スクリーニングのために用いる物（具体的には、スクリーニングのために用いるポリペプチド又はポリペプチドを発現している細胞）を意味する。「インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤スクリーニングツール」とは、インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤をスクリーニングするために、本発明の「インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤をスクリーニングする方法」において、試験化合物を接触させる対象となるポリペプチド又は細胞である。〔1〕～〔4〕に記載のポリペプチド、又は〔5〕に記載の細胞の、インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤スクリーニングのための使用も、本発明に含まれる。

【0012】

【発明の実施の形態】

1. 本発明のスクリーニングツール

本発明のインスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤スクリーニングツールには、ポリペプチド型スクリーニングツールと、細胞型スクリーニング

ツールとが含まれる。

【0013】

(1) ポリペプチド型スクリーニングツール

本発明のポリペプチド型スクリーニングツールとして用いることのできるポリペプチドとしては、例えば、

(i) 配列番号2で表されるアミノ酸配列又は配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(ii) 配列番号2で表されるアミノ酸配列又は配列番号4で表されるアミノ酸配列において、1又は複数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／又は付加されたアミノ酸配列からなるか、あるいは、配列番号2で表されるアミノ酸配列又は配列番号4で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、活性化されることにより、インスリン産生を促進する活性を示すポリペプチド（以下、機能的等価改変体と称する）；及び

(iii) 配列番号2で表されるアミノ酸配列又は配列番号4で表されるアミノ酸配列との相同性が80%以上であるアミノ酸配列からなり、しかも、活性化されることにより、インスリン産生を促進する活性を示すポリペプチド（以下、相同ポリペプチドと称する）

を挙げることができる。以下、本発明のポリペプチド型スクリーニングツールとして用いることのできるこれらの各種ポリペプチドを、総称して、スクリーニングツール用ポリペプチドと称する。

【0014】

スクリーニングツール用ポリペプチドの1つである、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドは、335個のアミノ酸残基からなるヒト由来のGタンパク質共役型受容体である。また、スクリーニングツール用ポリペプチドの1つである、配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドは、335個のアミノ酸残基からなるラット由来のGタンパク質共役型受容体である。配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるヒト由来のポリペプチドと、配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるラット由来のポリペプチドとは、アミノ酸配列の比較において80.6%の相同性を示す。

【0015】

なお、本明細書における前記「相同性」とは、BLAST (Basic local alignment search tool; Altschul, S. F. ら, J. Mol. Biol., 215, 403-410, 1990) により得られた値を意味し、アミノ酸配列の相同性は、BLAST検索アルゴリズムを用いて決定することができる。具体的には、BLASTパッケージ (sg i32bit版, バージョン2.0.12; NCBIより入手) の `blastp` プログラム (Tatiana A. Tatusova及びThomas L. Madden, FEMS Microbiol. Lett., 174, 247-250, 1999) を用い、デフォルトパラメーターに従って算出することができる。ペアワイズ・アラインメント・パラメーターとして、プログラム名「`blastp`」を使用し、Gap挿入Cost値を「0」で、Gap伸長Cost値を「0」で、Query配列のフィルターとして「SEG」を、Matrixとして「BLOSUM62」をそれぞれ使用する。

【0016】

配列番号2で表されるアミノ酸配列又は配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるこれらのポリペプチドは、活性化されることにより、インスリン産生を促進する活性（以下、インスリン産生促進活性と称することがある）を示す。

本明細書において、或るポリペプチドが「活性化されることにより、インスリン産生を促進する活性」を示すか否かは、特に限定されるものではないが、例えば、以下の方法（好ましくは、後述の実施例3に記載の方法）により確認することができる。すなわち、前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターと、前記ポリヌクレオチドを含まないコントロール用発現ベクターとで、それぞれ、細胞を形質転換する。この際、前記の各発現ベクターに加え、インスリンプロモーターの下流にレポーター遺伝子（例えば、ルシフェラーゼ遺伝子）を連結したプラスミドと一緒に、細胞を形質転換する。形質転換後、所定時間（例えば、24時間）培養した後、培地を除去し、細胞溶解液で細胞を溶解し、溶解液中のレポーター活性をそれぞれ測定する。コントロール用発現ベクターで形質転換した細胞（コントロール細胞）における溶解液中のレポーター活性に比べて、前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換した細胞（試験細胞）における溶解液中のレポーター活性が上昇して

いれば、前記ポリペプチドが「活性化されることにより、インスリン産生を促進する活性」を示すと判定することができる。

【0017】

本明細書において、Gタンパク質共役型受容体であるスクリーニングツール用ポリペプチドが「活性化」された状態とは、リガンドとの結合の有無に関わらず、Gタンパク質共役型受容体の下流にシグナルが伝達されている状態を意味する。活性型Gタンパク質共役型受容体の絶対量が一定量を越えた場合に、これらのポリペプチドは活性化される。

Gタンパク質共役型受容体は、不活性型と活性型との間の平衡状態にあり、リガンドがGタンパク質共役型受容体に結合することにより、平衡が活性型にシフトする。Gタンパク質共役型受容体を過剰に発現させた場合にも、活性型Gタンパク質共役型受容体の絶対量が増えるため、リガンド非存在下であっても、活性化され、下流にシグナルが伝達されることが知られている (Milano, C. A. ら, Science, 264, 582-586, 1994)。すなわち、Gタンパク質共役型受容体は、リガンドが特定されていない場合であっても、Gタンパク質共役型受容体を細胞に過剰発現させることにより、その受容体からのシグナルを検出することが可能な場合がある。後述の実施例3に記載の実験では、スクリーニングツール用ポリペプチドに対するリガンド非存在下であっても、これらのポリペプチドを過剰発現させることにより、アゴニストの結合による活性化と同じ状態に活性化されている。

【0018】

本発明のポリペプチド型スクリーニングツールとして用いることのできる機能的等価改変体は、配列番号2で表されるアミノ酸配列又は配列番号4で表されるアミノ酸配列の1又は複数の箇所において、1又は複数個（好ましくは全体として1～15個、より好ましくは1～10個、更に好ましくは1～7個、特に好ましくは1～5個）、例えば、1～数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、しかも、インスリン産生促進活性を示すことができるポリペプチドである限り、特に限定されるものではなく、その起源もヒト又はラットに限定されない。

【0019】

例えば、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのヒトにおける変異体、あるいは、配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのラットにおける変異体が含まれるだけでなく、ヒト及びラット以外の生物（例えば、マウス、ハムスター、又はイヌ）由来の機能的等価改変体が含まれる。更には、それらの天然ポリペプチド（すなわち、ヒト又はラット由来の変異体、あるいは、ヒト及びラット以外の生物由来の機能的等価改変体）、あるいは、配列番号2で表されるアミノ酸配列又は配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのアミノ酸配列を、遺伝子工学的に人為的に改変したポリペプチドなどが含まれる。なお、本明細書において「変異体」（variation）とは、同一種内の同一ポリペプチドにみられる個体差、あるいは、数種間の相同ポリペプチドにみられる差異を意味する。

【0020】

また、配列番号2で表されるアミノ酸配列又は配列番号4で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、インスリン産生促進活性を示すポリペプチドとして、例えば、配列番号2で表されるアミノ酸配列又は配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのN末端及び／又はC末端に、適当なマーカー配列等を付加したポリペプチド（すなわち、融合ポリペプチド）も、インスリン産生促進活性を示す限り、含まれる。

前記マーカー配列としては、ポリペプチドの発現の確認、細胞内局在の確認、あるいは、精製等を容易に行なうための配列を用いることができ、例えば、FLAGエピトープ、ヘキサ－ヒスチジン・タグ、ヘマグルチニン・タグ、又はmycエピトープなどを挙げることができる。

【0021】

本発明のポリペプチド型スクリーニングツールとして用いることのできる相同ポリペプチドは、配列番号2で表されるアミノ酸配列又は配列番号4で表されるアミノ酸配列との相同性が80%以上であるアミノ酸配列からなり、しかも、インスリン産生促進活性を示すポリペプチドである限り、特に限定されるものではないが、配列番号2で表されるアミノ酸配列又は配列番号4で表されるアミノ酸

配列に関して、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、更に好ましくは98%以上、特に好ましくは99%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなることができる。

【0022】

本発明のポリペプチド型スクリーニングツールとして用いることのできるスクリーニングツール用ポリペプチドは、種々の公知の方法によって得ることができ、例えば、国際公開WO02/44362号パンフレットに記載の方法に従って製造することができる。

【0023】

(2) 細胞型スクリーニングツール

本発明の細胞型スクリーニングツールとして用いることのできる細胞（以下、スクリーニングツール用細胞と称する）は、細胞型スクリーニングツールとして用いる際に前記ポリペプチドを発現している限り、特に限定されるものではなく、前記発現ベクターで形質転換された細胞であることもできるし、あるいは、スクリーニングツール用ポリペプチドを発現することが知られている天然の細胞又はその細胞株（例えば、膵臓β細胞株、好ましくはNIT1細胞）であることもできる。

本発明の細胞型スクリーニングツールとして用いることのできるスクリーニングツール用細胞としては、形質転換細胞が好ましく、例えば、

- (i) 配列番号2で表されるアミノ酸配列又は配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを発現している形質転換細胞；
 - (ii) 機能的等価改変体を発現している形質転換細胞；及び
 - (iii) 相同タンパク質を発現している形質転換細胞
- を挙げることができる。

【0024】

スクリーニングツール用細胞は、例えば、スクリーニングツール用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、適当なベクターDNAに再び組込むことにより、宿主細胞（好ましくは真核生物、特に好ましくは293-EBNA細胞）を形質転換させることにより取得することができる。また、これらのベクターに

適当なプロモーター及び形質発現にかかわる配列を導入することにより、それぞれの宿主細胞においてポリペプチドを発現させることが可能である。

【0025】

発現ベクターで形質転換された細胞としては、例えば、スクリーニングツール用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが、宿主細胞の染色体に組み込まれた細胞であることもできるし、あるいは、スクリーニングツール用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターの形で含有する細胞であることもできる。スクリーニングツール用細胞は、例えば、スクリーニングツール用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターにより、所望の宿主細胞を形質転換することにより得ることができ、より具体的には、例えば、国際公開WO 02/44362号パンフレットに記載の方法に従って製造することができる。

【0026】

2. インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤スクリーニング方法
スクリーニングツール用ポリペプチド又はスクリーニングツール用細胞を用いると、スクリーニングツール用ポリペプチドの活性を制御可能な物質、特には、スクリーニングツール用ポリペプチドを活性化する物質（すなわち、アゴニスト）をスクリーニングすることができる。先に述べたように、スクリーニングツール用ポリペプチドは、活性化されることにより、インスリン産生を促進する活性を有する。従って、スクリーニングツール用ポリペプチドを活性化する物質は、インスリン産生を促進することのできるインスリン含量増加剤の有効成分として有用である。従って、スクリーニングツール用ポリペプチドそれ自体、あるいは、スクリーニングツール用細胞それ自体を、インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤のスクリーニングツールとして使用することができる。

【0027】

本明細書において、「インスリン産生促進」とは、コントロール群に対して有意にインスリン産生促進活性が増加しており、かつ、コントロール群に対する試験化合物処理群のインスリン産生促進活性が、1.5倍以上（好ましくは5倍以上）である場合を意味する。

【0028】

本発明のスクリーニングツールを用いてスクリーニングにかけることのできる試験化合物としては、特に限定されるものではないが、例えば、ケミカルファイルに登録されている種々の公知化合物（ペプチドを含む）、コンビナトリアル・ケミストリー技術（Terrett, N. K. ら, Tetrahedron, 51, 8135-8137, 1995）によって得られた化合物群、あるいは、ファージ・ディスプレイ法（Felici, F. ら, J. Mol. Biol., 222, 301-310, 1991）などを応用して作成されたランダム・ペプチド群を用いることができる。また、微生物の培養上清、植物若しくは海洋生物由来の天然成分、又は動物組織抽出物などもスクリーニングの試験化合物として用いることができる。更には、本発明のインスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤スクリーニングツールにより選択された化合物（ペプチドを含む）を、化学的又は生物学的に修飾した化合物（ペプチドを含む）を用いることができる。

【0029】

本発明のスクリーニング方法は、受容体として機能するようにスクリーニングツール用ポリペプチドを発現しているスクリーニングツール用細胞又はその細胞膜と試験化合物とを接触させる工程、及び前記ポリペプチドが活性化されるか否かを分析する工程を含む限り、特に限定されるものではないが、前記ポリペプチドの活性化を分析するのに用いる方法の違いに基づいて、例えば、

- 1) 細胞内 cAMP 濃度の変動を指標とするスクリーニング方法（以下、cAMP 型スクリーニング方法と称する）、
- 2) GTP γ S 結合法を利用するスクリーニング方法（以下、GTP γ S 結合型スクリーニング方法と称する）、
- 3) リガンド結合アッセイ法を利用するスクリーニング方法（以下、リガンド結合型スクリーニング方法と称する）、及び
- 4) インスリンプロモーター活性を指標とした方法（以下、インスリンプロモーター活性型スクリーニング方法と称する）

を挙げることができる。

【0030】

本発明のスクリーニング方法は、cAMP型スクリーニング方法（特には実施例4に記載の方法）又はインスリンプロモーター活性型スクリーニング方法（特には実施例5に記載の方法）を用いることが好ましく、cAMP型スクリーニング方法（特には実施例4に記載の方法）及びインスリンプロモーター活性型スクリーニング方法（特には実施例5に記載の方法）を組み合わせる用いることがより好ましい。

また、形質転換細胞でなく、天然の細胞又はその細胞株を用いてスクリーニングを行なった場合には、前記(i)～(iii)の形質転換細胞をスクリーニングツールとして用い、スクリーニングツール用ポリペプチドを活性化することを確認することが望ましい。

【0031】

1) cAMP型スクリーニング方法

細胞内cAMP濃度の変動を指標として、インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤の有効成分として有用な、スクリーニングツール用ポリペプチドを活性化する物質（すなわち、アゴニスト）をスクリーニングする場合には、スクリーニングツール用細胞と、試験化合物とを接触させ、前記細胞内のcAMP濃度の変化を直接的又は間接的に分析（すなわち、測定又は検出）することにより、前記ポリペプチドが活性化されるか否かを分析する。すなわち、細胞内cAMP濃度の変動を指標とする本発明のcAMP型スクリーニング方法では、スクリーニングツール用細胞と試験化合物とを接触させる工程、及び前記細胞内におけるcAMP濃度の変化を分析する工程を含む。より具体的には、後述の実施例4に記載の方法により実施することが好ましい。例えば、試験化合物を一定時間作用させ、細胞内cAMP濃度の上昇を指標に、コントロール細胞に対して、スクリーニングツール用細胞において1.5倍以上（好ましくは5倍以上）の活性上昇を示す試験化合物をアゴニスト活性を有する物質として選択することができる。

【0032】

cAMP濃度の変化は、例えば、市販のcAMP測定キット（Amersham社等）を用いて、直接的にcAMP濃度の変化を分析することもできるし、あるいは、

後述の実施例 4 に示すように、cAMP 濃度に依存して転写量が調節される遺伝子 [例えば、ルシフェラーゼの遺伝子上流に cAMP 応答配列 (CRE) を挿入した遺伝子] の転写活性を分析することにより、間接的に cAMP 濃度の変化を分析することもできる。

【0033】

スクリーニングツール用細胞と試験化合物とを接触させた場合に、前記細胞内の cAMP 濃度が上昇すれば、前記試験化合物は、スクリーニングツール用ポリペプチドに対するアゴニストであると判定することができる。なお、コントロール細胞として、スクリーニングツール用細胞の代わりに、スクリーニングツール用ポリペプチドが発現されていない宿主細胞、あるいは、空ベクターで形質転換した形質転換細胞を用いて同様の操作を行ない、前記試験化合物によりこれらのコントロール細胞内の cAMP 濃度が上昇しないことを確認することが好ましい。

【0034】

市販の cAMP 測定キット (Amersham 社等) を用いて、直接的に cAMP 濃度の変化を分析することにより、スクリーニングツール用ポリペプチドを活性化する物質をスクリーニングする場合には、例えば、以下の手順により実施することができる。すなわち、スクリーニングツール用ポリペプチドをコードする遺伝子を導入した細胞を、遺伝子導入した後、20 時間培養し、続いて、培地を吸引した後、1 mmol/L-IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine) /DMEM 400 μ L を加え、5% CO₂ 存在下、37°C で 10 分間インキュベートする。更に、1 mmol/L-IBMX /DMEM 100 μ L で希釈した試験化合物 (例えば、化合物、ペプチド、又は抗体等) を添加し、更に 30 分間インキュベートする。培地を吸引し、得られた細胞における cAMP 量を、市販の cAMP 測定キット [例えば、cAMP 酵素免疫アッセイ系 (cAMP enzyme immunoassay system; Amersham pharmacia biotech 社)] を用いて測定する。試験化合物存在下における特異的な cAMP 量の上昇が観察された試験化合物を、スクリーニングツール用ポリペプチドを活性化する物質、すなわち、インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤としてスクリーニング

することができる。

【0035】

cAMP濃度に依存して転写量が調節される遺伝子の転写活性を分析し、間接的にcAMP濃度の変化を分析することにより、スクリーニングツール用ポリペプチドを活性化する物質をスクリーニングする場合には、例えば、後述の実施例4に示すように、以下の手順により実施することができる。すなわち、スクリーニングツール用ポリペプチドをコードする遺伝子と、cAMP濃度に依存して転写量が調節される遺伝子〔例えば、ルシフェラーゼの遺伝子上流にcAMP応答配列(CRE)を挿入した遺伝子；例えば、pCRE-Lucベクター(CLOTECH社)〕とを導入した細胞を、遺伝子導入した後、18～20時間培養し、培地で希釈した試験化合物を加え、5%CO₂存在下、37℃で5～6時間インキュベートする。培地を吸引し、細胞溶解液で溶解した後、そのルシフェラーゼ活性を測定する。試験化合物存在下における特異的なレポーター活性の上昇が観察された物質等を、スクリーニングツール用ポリペプチドを活性化する物質、すなわち、インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤としてスクリーニングすることができる。

【0036】

2) GTP γ S結合型スクリーニング方法

GTP γ S結合法(Lazareno, S.及びBirdsall, N. J. M., Br. J. Pharmacol., 109, 1120-1127, 1993)を利用して、インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤の有効成分として有用な、スクリーニングツール用ポリペプチドを活性化する物質(すなわち、アゴニスト)をスクリーニングする場合には、例えば、以下の手順により実施することができる。すなわち、スクリーニングツール用ポリペプチドを発現させた細胞膜を、20mmol/L-HEPES(pH 7.4)、100mmol/L-NaCl、10mmol/L-MgCl₂、及び50mmol/L-GDP混合溶液中で、³⁵Sで標識されたGTP γ S(400pmol/L)と混合する。試験化合物存在下と試験化合物不在下とでインキュベートした後、反応液をガラスフィルター等で濾過し、フィルターに残存するGTP γ Sの放射活性を液体シンチレーションカウンター等で測定する。試

験化合物存在下における特異的な GTP γ S 結合の上昇を指標に、スクリーニングツール用ポリペプチドに対するアゴニスト、すなわち、インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤をスクリーニングすることができる。

【0037】

GTP γ S 結合法を利用する本発明の GTP γ S 結合型スクリーニング方法では、³⁵S で標識された GTP γ S 存在下において、スクリーニングツール用細胞の細胞膜と試験化合物とを接触させる工程、及び前記細胞膜と結合した GTP γ S と、未結合の GTP γ S とを分離し、分離されたいずれか一方に含まれる放射活性を分析する工程を含む。

【0038】

3) リガンド結合型スクリーニング方法

リガンド結合アッセイ法を利用して、インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤の有効成分として有用な、スクリーニングツール用ポリペプチドに結合する物質をスクリーニングする場合には、例えば、以下の手順により実施することができる。すなわち、スクリーニングツール用ポリペプチドを発現させたスクリーニングツール用細胞、若しくはその細胞膜、又はスクリーニングツール用ポリペプチド（好ましくはその精製標品）を調製する。緩衝液、イオン、及び／又は pH のようなアッセイ条件を最適化し、最適化したバッファー中で、前記ポリペプチドを発現させた形質転換細胞若しくはその細胞膜、又は前記ポリペプチドと、例えば、前記 cAMP 型スクリーニング方法及び／又は GTP γ S 結合型スクリーニング方法で取得することができる物質（すなわち、アゴニスト）の標識体とを、試験化合物と共に一定時間インキュベーションする。反応後、ガラスフィルター等で濾過し、適量のバッファーで洗浄した後、フィルターに残存する放射活性を液体シンチレーションカウンター等で測定する。得られた標識体の結合阻害を指標に、スクリーニングツール用ポリペプチドのリガンドを選択することができる。なお、このリガンドが、アゴニスト又はアンタゴニストであるかについては、前記 cAMP 型スクリーニング方法及び／又は GTP γ S 結合型スクリーニング方法などにより確認することができる。

【0039】

4) インスリンプロモーター活性型スクリーニング方法

インスリンプロモーター活性を指標として、インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤の有効成分として有用な、スクリーニングツール用ポリペプチドを活性化する物質（すなわち、アゴニスト）をスクリーニングする場合には、スクリーニングツール用細胞と、試験化合物とを接触させ、前記細胞内のインスリンプロモーター活性の変化を分析（すなわち、測定又は検出）することにより、前記ポリペプチドが活性化されるか否かを分析する。

【0040】

インスリンプロモーター活性の変化は、例えば、後述の実施例 5 に示すように、インスリンプロモーターの下流にレポーター遺伝子（例えば、ルシフェラーゼ遺伝子）を連結したプラスミドを用いて、その転写活性を分析することにより、インスリンプロモーター活性の変化を分析することができる。

より具体的には、例えば、インスリンプロモーターの下流にレポーター遺伝子（例えば、ルシフェラーゼ遺伝子）を連結したプラスミドを、スクリーニングツール用細胞に導入した後、18～20時間培養し、培地で希釈した試験化合物を加え、5%CO₂存在下、37℃で24時間インキュベートする。培地を吸引し、細胞溶解液で溶解した後、そのレポーター活性（例えば、ルシフェラーゼ活性）を測定する。試験化合物存在下における特異的なレポーター活性の上昇が観察された物質等を、スクリーニングツール用ポリペプチドを活性化する物質、すなわち、インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤としてスクリーニングすることができる。なお、コントロール細胞として、スクリーニングツール用細胞の代わりに、スクリーニングツール用ポリペプチドを発現していない細胞を用いて同様の操作を行ない、前記試験化合物によりこれらのコントロール細胞では、インスリンプロモーターレポーター活性が上昇しないことを確認することが好ましい。

【0041】

3. インスリン産生促進用及び／又はインスリン含量増加用医薬組成物

本発明には、例えば、本発明のスクリーニング方法で選択することのできる、スクリーニングツール用ポリペプチドを活性化する物質 [例えば、DNA、タン

パク質（抗体又は抗体断片を含む）、ペプチド、又はそれ以外の化合物］を有効成分とするインスリン産生促進用及び／又はインスリン含量増加用医薬組成物が包含される。

【0042】

また、インスリン産生促進用及び／又はインスリン含量増加用医薬組成物の品質規格の確認試験において、（１）スクリーニングツール用細胞、又はその細胞膜と、試験化合物とを接触させる工程、及びスクリーニングツール用ポリペプチドが活性化されるか否かを分析する工程、あるいは、（２）スクリーニングツール用細胞、又はその細胞膜と、試験化合物とを、スクリーニングツール用ポリペプチドの標識アゴニスト存在下で、接触させる工程、及び前記細胞又はその細胞膜への標識アゴニストの結合量の変化を分析する工程からなる分析を行ない、次いで、分析した物質を製剤化することからなる、インスリン産生促進用及び／又はインスリン含量増加用医薬組成物の製造方法も本発明に含まれる。

また、前記工程による分析を含む本発明のスクリーニング方法で得られた物質を製剤化することからなる、インスリン産生促進用及び／又はインスリン含量増加用医薬組成物の製造方法も本発明に含まれる。

【0043】

本発明の医薬組成物における有効成分としては、スクリーニングツール用ポリペプチドを活性化する物質を用いることができ、前記活性化物質は、例えば、本発明のスクリーニング方法により選択することができる。本発明の医薬組成物は、本発明のスクリーニング方法で得られた物質を有効成分とする医薬組成物に限定されず、スクリーニングツール用ポリペプチドを活性化する物質を有効成分とするインスリン産生促進用及び／又はインスリン含量増加用医薬組成物であれば全て包含される。

【0044】

なお、インスリン産生及びインスリン含量の増加の確認は、当業者に公知の方法、あるいは、それを改良した方法を用いることにより実施することができる。例えば、スクリーニングツール用ポリペプチドを活性化する物質を糖尿病モデル動物に連続投与し、脾臓中のインスリン mRNA 又はインスリタンパク質の量

を測定することにより確認することができ、更には、前述の条件のもと、常法に従って随時血糖低下作用を確認することにより、あるいは、経口糖負荷試験後の血糖上昇抑制作用の確認を行なうことにより、糖尿病治療効果の有無を判定することができる。

【0045】

スクリーニングツール用ポリペプチドを活性化する物質 [例えば、DNA、タンパク質 (抗体又は抗体断片を含む)、ペプチド、又はそれ以外の化合物] を有効成分とする製剤は、前記有効成分のタイプに応じて、それらの製剤化に通常用いられる薬理学上許容される担体、賦形剤、及び/又はその他の添加剤を用いて、医薬組成物として調製することができる。本発明は、スクリーニングツール用ポリペプチドを活性化する物質を投与する工程を含む、インスリン産生促進及びインスリン含量の増加方法である。

【0046】

投与としては、例えば、錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、又は経口用液剤などによる経口投与、あるいは、静注若しくは筋注などの注射剤、坐剤、経皮投与剤、又は経粘膜投与剤などによる非経口投与を挙げることができる。特に胃で消化されるペプチドにあっては、静注等の非経口投与が好ましい。

【0047】

経口投与のための固体組成物においては、1又はそれ以上の活性物質と、少なくとも一つの不活性な希釈剤、例えば、乳糖、マンニトール、ブドウ糖、微結晶セルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、デンプン、又はポリビニルピロリドン、メタケイ酸アルミン酸マグネシウムなどと混合することができる。前記組成物は、常法に従って、不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば、滑沢剤、崩壊剤、安定化剤、又は溶解若しくは溶解補助剤などを含有することができる。錠剤又は丸剤は、必要により糖衣又は胃溶性若しくは腸溶性物質などのフィルムで被覆することができる。

経口のための液体組成物は、例えば、乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤、又はエリキシル剤を含むことができ、一般的に用いられる不活性な希釈剤、例えば、精製水又はエタノールを含むことができる。前記組成物は、不活性な希釈剤

以外の添加剤、例えば、湿潤剤、懸濁剤、甘味剤、芳香剤、又は防腐剤を含有することができる。

【0048】

非経口のための注射剤としては、無菌の水性若しくは非水性の溶液剤、懸濁剤、又は乳濁剤を含むことができる。水溶性の溶液剤又は懸濁剤には、希釈剤として、例えば、注射用蒸留水又は生理用食塩水などを含むことができる。非水溶性の溶液剤又は懸濁剤の希釈剤としては、例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油（例えば、オリーブ油）、アルコール類（例えば、エタノール）、又はポリソルベート 80 等を含むことができる。前記組成物は、更に湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤、溶解若しくは溶解補助剤、又は防腐剤などを含むことができる。前記組成物は、例えば、バクテリア保留フィルターを通す濾過、殺菌剤の配合、又は照射によって無菌化することができる。また、無菌の固体組成物を製造し、使用の際に、無菌水又はその他の無菌用注射用媒体に溶解し、使用することもできる。

【0049】

投与量は、有効成分の活性の強さ、症状、投与対象の年齢、又は性別等を考慮して、適宜決定することができる。

例えば、経口投与の場合、その投与量は、通常、成人（体重 60 kg として）において、1 日につき約 0.1 ~ 100 mg、好ましくは 0.1 ~ 50 mg である。非経口投与の場合、注射剤の形では、1 日につき 0.01 ~ 50 mg、好ましくは 0.01 ~ 10 mg である。

【0050】

【実施例】

以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。なお、特に断らない限り、公知の方法（"Molecular Cloning-A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1982 等）に従って実施した。

【0051】

【実施例 1】

《配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを含む発現ベクターの製造》

国際公開 WO 02/44362 号パンフレットの実施例 1 に記載の手順に従って、配列番号 1 で表される塩基配列を有する DNA を取得し、pEF-BOS プラスミドに導入した（以下、プラスミド pEF-BOS-NA と称する）。次いで、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを発現させるために、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする全長 DNA を導入した pEF-BOS シグナルシーケンスフラッグプラスミド（以下、プラスミド pEF-BOS SSF-NA と称する）を製造した。これは、目的とするポリペプチドの N 末端にシグナルシーケンスを付加することができる発現ベクターを用いることにより、目的ポリペプチドを細胞膜に高頻度に発現させるためである。

【0052】

【実施例 2】

《ヒトインスリンプロモーターレポータープラスミドの構築》

ヒトのインスリン遺伝子の 5' 発現制御領域は、塩基配列が同定されており（Nature, 284, 26-32, 1980）、転写因子結合部位として知られる複数のシス（cis）エレメントは、マウスやラットのインスリン遺伝子の 5' 発現制御領域にも共通に存在している（Diabetes, 44, 1002-1004, 1995）。これらの種を越えて共通のシスエレメントを含み、且つプロモーター活性を示すのに充分と考えられる領域（本実施例では、-342 から +37 の領域を使用した。なお、数字の +1 は、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 95, 11572-11577, 1998 に示された想定上の転写開始点を表す）を、ヒトゲノム DNA（Cat. No. 6550-1; Clontech 社）を用いて 5' 側に HindIII サイト、3' 側に NcoI サイトができるようにしてポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により増幅し、プラスミド pCR2.1-Topo（Cat. No. K455001, TA クローニングシステム; Invitrogen 社）にクローニングした。

【0053】

具体的な PCR の増幅条件は次の通りである。DNA ポリメラーゼ（Ampli Ta

q DNAポリメラーゼ; Applied Biosystems社) を用いて、1 サイクル当たり、94℃で30秒間、2本鎖DNAを熱変性し、55℃で30秒間、プライマーを変性した1本鎖DNAにアニーリングさせ、引き続き、72℃で1分間、DNA伸長反応させた。これを30サイクル繰り返した。PCRに用いたプライマー [Ins17 (h) 及び Ins19 (h)] の塩基配列を配列番号5及び6に示す。

【0054】

次に、増幅断片がクローニングされたプラスミドを、制限酵素HindIII (宝酒造) 及びNcoI (宝酒造) を用いて消化することによりプラスミドから増幅断片を切り出し、ルシフェラーゼ遺伝子を含むプラスミド (Cat. No. 306-04831, ルシフェラーゼベクターpGV-B2; 東洋インキ) のルシフェラーゼ遺伝子の開始コドンのNcoIサイトとその5' 上流に位置するHindIIIサイトとの間にクローニングした。クローニングしたヒトインスリンプロモーターの塩基配列は、ジデオキシターミネーター (dideoxy terminator) 法によりDNAシーケンサー (ABI377 DNA Sequencer; Applied Biosystems社) を用いて決定した。決定した塩基配列を配列番号7に示す。

【0055】

このようにして、ヒトインスリンプロモーターレポータープラスミドpIns-Luc380 (以下、プラスミドInsProと称する) を構築した。なお、このプラスミドを細胞に導入し、このプラスミドに含まれるインスリンプロモーター部分が活性化されれば、ルシフェラーゼ遺伝子が生合成される。このルシフェラーゼ活性を測定することにより、インスリンプロモーター活性を測定することができる。

【0056】

【実施例3】

《配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドの過剰発現によるインスリンプロモーターレポーター活性の変化》

配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのセカンドメッセンジャーの1つは、cAMPであることが知られている (国際公開WO02/44362号パンフレットの実施例4参照)。

本実施例では、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドの過剰発現によるインスリンプロモーター活性に与える影響を検討した。

【0057】

96穴プレートに、マウス膵 β 細胞株NIT1細胞 (4×10^4 細胞/ウェル; ATCC: CRL-2055) を播種し、10%牛胎児血清 (FCS) を含むF-12培地中で一晚培養した後、トランスフェクション試薬 (FuGENE6; Boehringer Mannheim社) を用いて、前記細胞にプラスミドpEF-BOS SSF-NA (10 ng) と実施例2で作製したプラスミドInsPro (1 ng) とを遺伝子導入した。なお、コントロールとして、プラスミドpEF-BOS (コントロール用の空ベクター) とプラスミドInsProとを遺伝子導入した。遺伝子導入した後、更に24時間培養し、培地を吸引した後、細胞溶解液 (細胞溶解液LC β ; 東洋インキ) で溶解し、そのルシフェラーゼ活性を、市販の測定キット (ピッカジーン発光キット; 東洋インキ) 及び測定装置 (ML3000 microtiter plate luminometer; Dynatech Laboratories社) を用いて測定した。

【0058】

結果 (平均値 \pm 標準偏差, $n=4$) を図1に示す。図1に示すように、プラスミドpEF-BOS SSF-NAを導入した細胞では、プラスミドpEF-BOSを導入した細胞と比較して、有意なインスリンプロモーター活性の上昇が確認された。スチューデントのt-テストによれば、 $P=0.0018$ であった。従って、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを過剰発現させることにより、すなわち、活性化させることにより、インスリンプロモーター活性が上昇することが判明した。

【0059】

以上の結果より、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを活性化してインスリンプロモーター活性を上昇させることにより、インスリン合成が増加し、結果としてインスリン含量が増えると考えられた。従って、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドの「アゴニスト」は、糖尿病の予防及び/又は治療薬、特に、インスリン含量 (生合成) 増加薬となると考えられた。ここでいう「アゴニスト」とは、配列番号2で表されるアミノ酸配

列からなるポリペプチドのシグナルを増強させ、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドの作用を増強させる、すなわち、このポリペプチドを活性化させる、物質の総称である。

【0060】

【実施例4】

《細胞内cAMP濃度の変化を指標とした、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドの活性を修飾する物質のスクリーニング》

本実施例では、宿主細胞として、ヒト胎児腎臓由来HEK293細胞にエプスタイン・バーウイルスのEBNA-1遺伝子を導入した293-EBNA細胞（Invitrogen社）を使用した。

コラーゲンコートした96穴プレートに293-EBNA細胞（ 1×10^4 細胞/ウェル）を播種し、10%牛胎児血清（FCS）を含むダルベッコ変法イーグル培地（DMEM）中で一晩培養した後、トランスフェクション試薬（LIPOFECTAMINE 2000; GIBCO BRL社）を用いて、前記細胞にプラスミドpEF-BOS-NA又はプラスミドpEF-BOS（コントロール用の空ベクター）0.01ngとpCRE-Lucベクター（CLONTECH社）5ngとを遺伝子導入した。遺伝子導入した後、更に18～20時間培養し、培地で希釈した試験化合物を加え、5%CO₂存在下、37℃で5～6時間インキュベートした。培地を吸引し、細胞溶解液（細胞溶解液LCβ；東洋インキ）で溶解した後、そのルシフェラーゼ活性を、市販の測定キット（ピッカジーン発光キット；東洋インキ）及び測定装置（ML3000 microtiter plate luminometer; Dynatech Laboratories社）を用いて測定した。

【0061】

プラスミドpEF-BOSを導入した細胞における試験化合物処理によるレポーター活性値の上昇に対し、試験化合物処理により、プラスミドpEF-BOS-NAを導入した細胞で1.5倍（好ましくは5倍）以上のレポーター活性値の上昇を確認することができれば、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを活性化させる作用を有する化合物として選択することができる。また、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを発現させた細胞

を用いて、試験化合物処理後の細胞内 cAMP 量を既存の方法により直接測定することによっても試験化合物の活性を測定することができる。

本実施例に記載の方法は、実施例 5 により選択される化合物が、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを活性化する化合物であるか否かの確認にも利用することができる。

【0062】

【実施例 5】

《インスリンプロモーターレポーター活性を指標としたスクリーニング法》

配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを活性化する物質は、前記ポリペプチドを発現していない細胞に、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド及びプラスミド *InsPro* を導入し、スクリーニングすることも可能である。また、本実施例で示すように、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドに対応するマウス由来ポリペプチドが発現していることが知られている（国際公開 WO 02/44362 号パンフレットの実施例 2 及び 3 参照）膵 β 細胞株にプラスミド *InsPro* を導入し、化合物を評価することも可能である。

本実施例に示すスクリーニング法は、実施例 4 で選択される化合物のインスリンプロモーター活性増強作用の確認としても使用することができる。

【0063】

マウス膵 β 細胞株 *NIT1* (4×10^4 細胞) に、トランスフェクション試薬 (LIPOFECTAMINE 2000; GIBCO BRL 社又は FuGENE6; Boehringer Mannheim 社) を用いて、実施例 2 で作製したプラスミド *InsPro* (1~10 ng) を導入し、96 穴プレートに播種した。培地としては、10% 牛胎児血清 (FCS) を含む、ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) 又は F-12 培地を用いた。播種後、18~20 時間培養し、培地で希釈した試験化合物を加え、5% CO₂ 存在下、37℃ で 24 時間インキュベートした。培地を吸引し、細胞溶解液 (細胞溶解液 LC β ; 東洋インキ) で溶解した後、そのルシフェラーゼ活性を、市販の測定キット (ピッカジーン発光キット; 東洋インキ) 及び測定装置 (ML3000 microtiter plate luminometer; Dynatech Laboratories 社) を用いて測定した。試験化合

物処理により、コントロール（溶媒のみ）に対し有意なレポーター活性の上昇を確認することができた場合、インスリンプロモーター活性化作用を有する化合物と判断することができる。さらに、コントロール細胞として、スクリーニングツール用細胞の代わりに、スクリーニングツール用ポリペプチドを発現していない細胞を用いて同様の操作を行ない、前記試験化合物によりこれらのコントロール細胞では、インスリンプロモーターレポーター活性が上昇しない場合、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを活性化する化合物として判断することができる。

【0064】

以上、実施例 4 あるいは実施例 5 単独で、又はこれらを組み合わせて行なうことにより、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを活性化させ、インスリンプロモーター活性を上昇させる化合物を選択することができる。

【実施例 6】《細胞内 cAMP 濃度の変化およびインスリンプロモーターレポーター活性を指標とした、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドの活性を修飾する物質のスクリーニング》

実施例 4 に記載の方法で化合物スクリーニングを行った。その結果、2-（ピリジン-4-イル）エチル チオベンゾエート（LT-1 Z 0059519；LaboTest 社）を取得することができた。2-（ピリジン-4-イル）エチル チオベンゾエート（ $1.0 \mu\text{M}$ ）は、プラスミド pEF-BOS を導入した細胞におけるレポーター活性値の上昇に対し、プラスミド pEF-BOS-NA を導入した細胞で 3 倍以上のレポーター活性値の上昇を確認することができたので、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを活性化させる作用を有する化合物として選択した。

つぎに、実施例 5 に準じて 2-（ピリジン-4-イル）エチル チオベンゾエートを評価した。ただし、96 穴プレートは、コラーゲンコートされた 96 穴プレートを使用し、培地は、DMEM を用いた。また、化合物処理を 31 時間行った。結果（平均値 \pm SE、 $n=6$ ）を図 2 に示す。2-（ピリジン-4-イル）エチル チオベンゾエート（ $30 \mu\text{M}$ ）処理群のレポーター活性値は、コントロールすなわち化合物濃度 $0 \mu\text{M}$ 群のレポーター活性値よりも有意に大きかった（1

．5倍以上)。図2に示す記号「**」は、コントロール群[すなわち、2-(ピリジン-4-イル)エチル チオベンゾエート無添加群]に対する有意差が、 $p < 0.01$ (スチューデントのt検定)であることを意味する。

以上、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを活性化させる2-(ピリジン-4-イル)エチル チオベンゾエートは、インスリンプロモーター活性を上昇させること、すなわちインスリン産生促進活性を有することがわかった。したがって、この化合物は、インスリン含量を増加させることが期待される。

【0065】

【発明の効果】

本発明のスクリーニングツール又はスクリーニング方法によれば、インスリン産生を促進することのできるインスリン含量増加剤をスクリーニングすることができる。前記インスリン含量増加剤は、糖尿病予防及び／又は治療に有効な物質である。

【0066】

【配列表フリーテキスト】

配列表の配列番号5及び6の配列で表される各塩基配列は、人工的に合成したプライマー配列である。

【0067】

【配列表】

<110> Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> Screening method of agents for increasing insulin content

<130> 3243GIA

<160> 7

<210> 1

<211> 1008

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Inventor: Ohishi, Takahide; Koizumi, Tomonobu

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1008)

<400> 1

atg gaa tca tct ttc tca ttt gga gtg atc ctt gct gtc ctg gcc tcc 48

Met Glu Ser Ser Phe Ser Phe Gly Val Ile Leu Ala Val Leu Ala Ser

1 5 10 15

ctc atc att gct act aac aca cta gtg gct gtg gct gtg ctg ctg ttg 96

Leu Ile Ile Ala Thr Asn Thr Leu Val Ala Val Ala Val Leu Leu Leu

20 25 30

atc cac aag aat gat ggt gtc agt ctc tgc ttc acc ttg aat ctg gct 144

Ile His Lys Asn Asp Gly Val Ser Leu Cys Phe Thr Leu Asn Leu Ala

35 40 45

gtg gct gac acc ttg att ggt gtg gcc atc tct ggc cta ctc aca gac 192

Val Ala Asp Thr Leu Ile Gly Val Ala Ile Ser Gly Leu Leu Thr Asp

50 55 60

cag ctc tcc agc cct tct cgg ccc aca cag aag acc ctg tgc agc ctg 240

Gln Leu Ser Ser Pro Ser Arg Pro Thr Gln Lys Thr Leu Cys Ser Leu
 65 70 75 80

cgg atg gca ttt gtc act tcc tcc gca gct gcc tct gtc ctc acg gtc 288
 Arg Met Ala Phe Val Thr Ser Ser Ala Ala Ala Ser Val Leu Thr Val
 85 90 95

atg ctg atc acc ttt gac agg tac ctt gcc atc aag cag ccc ttc cgc 336
 Met Leu Ile Thr Phe Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Lys Gln Pro Phe Arg
 100 105 110

tac ttg aag atc atg agt ggg ttc gtg gcc ggg gcc tgc att gcc ggg 384
 Tyr Leu Lys Ile Met Ser Gly Phe Val Ala Gly Ala Cys Ile Ala Gly
 115 120 125

ctg tgg tta gtg tct tac ctc att ggc ttc ctc cca ctc gga atc ccc 432
 Leu Trp Leu Val Ser Tyr Leu Ile Gly Phe Leu Pro Leu Gly Ile Pro
 130 135 140

atg ttc cag cag act gcc tac aaa ggg cag tgc agc ttc ttt gct gta 480
 Met Phe Gln Gln Thr Ala Tyr Lys Gly Gln Cys Ser Phe Phe Ala Val
 145 150 155 160

ttt cac cct cac ttc gtg ctg acc ctc tcc tgc gtt ggc ttc ttc cca 528
 Phe His Pro His Phe Val Leu Thr Leu Ser Cys Val Gly Phe Phe Pro
 165 170 175

gcc atg ctc ctc ttt gtc ttc ttc tac tgc gac atg ctc aag att gcc 576
 Ala Met Leu Leu Phe Val Phe Phe Tyr Cys Asp Met Leu Lys Ile Ala

180	185	190	
tcc atg cac agc cag cag att cga aag atg gaa cat gca gga gcc atg			624
Ser Met His Ser Gln Gln Ile Arg Lys Met Glu His Ala Gly Ala Met			
195	200	205	
gct gga ggt tat cga tcc cca cgg act ccc agc gac ttc aaa gct ctc			672
Ala Gly Gly Tyr Arg Ser Pro Arg Thr Pro Ser Asp Phe Lys Ala Leu			
210	215	220	
cgt act gtg tct gtt ctc att ggg agc ttt gct cta tcc tgg acc ccc			720
Arg Thr Val Ser Val Leu Ile Gly Ser Phe Ala Leu Ser Trp Thr Pro			
225	230	235	240
ttc ctt atc act ggc att gtg cag gtg gcc tgc cag gag tgt cac ctc			768
Phe Leu Ile Thr Gly Ile Val Gln Val Ala Cys Gln Glu Cys His Leu			
245	250	255	
tac cta gtg ctg gaa cgg tac ctg tgg ctg ctc ggc gtg ggc aac tcc			816
Tyr Leu Val Leu Glu Arg Tyr Leu Trp Leu Leu Gly Val Gly Asn Ser			
260	265	270	
ctg ctc aac cca ctc atc tat gcc tat tgg cag aag gag gtg cga ctg			864
Leu Leu Asn Pro Leu Ile Tyr Ala Tyr Trp Gln Lys Glu Val Arg Leu			
275	280	285	
cag ctc tac cac atg gcc cta gga gtg aag aag gtg ctc acc tca ttc			912
Gln Leu Tyr His Met Ala Leu Gly Val Lys Lys Val Leu Thr Ser Phe			
290	295	300	

ctc ctc ttt ctc tcg gcc agg aat tgt ggc cca gag agg ccc agg gaa 960

Leu Leu Phe Leu Ser Ala Arg Asn Cys Gly Pro Glu Arg Pro Arg Glu

305 310 315 320

agt tcc tgt cac atc gtc act atc tcc agc tca gag ttt gat ggc taa 1008

Ser Ser Cys His Ile Val Thr Ile Ser Ser Ser Glu Phe Asp Gly

325 330 335

<210> 2

<211> 335

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Glu Ser Ser Phe Ser Phe Gly Val Ile Leu Ala Val Leu Ala Ser

1 5 10 15

Leu Ile Ile Ala Thr Asn Thr Leu Val Ala Val Ala Val Leu Leu Leu

20 25 30

Ile His Lys Asn Asp Gly Val Ser Leu Cys Phe Thr Leu Asn Leu Ala

35 40 45

Val Ala Asp Thr Leu Ile Gly Val Ala Ile Ser Gly Leu Leu Thr Asp

50 55 60

Gln Leu Ser Ser Pro Ser Arg Pro Thr Gln Lys Thr Leu Cys Ser Leu

65 70 75 80

Arg Met Ala Phe Val Thr Ser Ser Ala Ala Ala Ser Val Leu Thr Val

85 90 95

Met Leu Ile Thr Phe Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Lys Gln Pro Phe Arg

100	105	110
Tyr Leu Lys Ile Met Ser Gly Phe Val Ala Gly Ala Cys Ile Ala Gly		
115	120	125
Leu Trp Leu Val Ser Tyr Leu Ile Gly Phe Leu Pro Leu Gly Ile Pro		
130	135	140
Met Phe Gln Gln Thr Ala Tyr Lys Gly Gln Cys Ser Phe Phe Ala Val		
145	150	155
Phe His Pro His Phe Val Leu Thr Leu Ser Cys Val Gly Phe Phe Pro		
165	170	175
Ala Met Leu Leu Phe Val Phe Phe Tyr Cys Asp Met Leu Lys Ile Ala		
180	185	190
Ser Met His Ser Gln Gln Ile Arg Lys Met Glu His Ala Gly Ala Met		
195	200	205
Ala Gly Gly Tyr Arg Ser Pro Arg Thr Pro Ser Asp Phe Lys Ala Leu		
210	215	220
Arg Thr Val Ser Val Leu Ile Gly Ser Phe Ala Leu Ser Trp Thr Pro		
225	230	235
Phe Leu Ile Thr Gly Ile Val Gln Val Ala Cys Gln Glu Cys His Leu		
245	250	255
Tyr Leu Val Leu Glu Arg Tyr Leu Trp Leu Leu Gly Val Gly Asn Ser		
260	265	270
Leu Leu Asn Pro Leu Ile Tyr Ala Tyr Trp Gln Lys Glu Val Arg Leu		
275	280	285
Gln Leu Tyr His Met Ala Leu Gly Val Lys Lys Val Leu Thr Ser Phe		
290	295	300
Leu Leu Phe Leu Ser Ala Arg Asn Cys Gly Pro Glu Arg Pro Arg Glu		
305	310	315
Ser Ser Cys His Ile Val Thr Ile Ser Ser Ser Glu Phe Asp Gly		
325	330	335

<210> 3
<211> 1008
<212> DNA
<213> Rattus sp.

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1008)

<400> 3
atg gag tca tct ttc tca ttt gga gtg atc ctt gct gtc ctg acc atc 48
Met Glu Ser Ser Phe Ser Phe Gly Val Ile Leu Ala Val Leu Thr Ile
1 5 10 15

ctt atc att gct gtt aat gcg ctg gtg gtt gtg gct atg ctg cta tca 96
Leu Ile Ile Ala Val Asn Ala Leu Val Val Val Ala Met Leu Leu Ser
20 25 30

atc tac aag aat gat ggt gtt ggc ctt tgc ttc acc tta aat ctg gcc 144
Ile Tyr Lys Asn Asp Gly Val Gly Leu Cys Phe Thr Leu Asn Leu Ala
35 40 45

gtg gct gat acc ttg att ggc gtg gct att tct ggg cta gtt aca gac 192
Val Ala Asp Thr Leu Ile Gly Val Ala Ile Ser Gly Leu Val Thr Asp
50 55 60

cag ctc tcc agc tct gct cag cac aca cag aag acc ttg tgt agc ctt 240

Gln Leu Ser Ser Ser Ala Gln His Thr Gln Lys Thr Leu Cys Ser Leu
 65 70 75 80

cgg atg gca ttc gtc act tct tct gca gcc gcc tct gtc ctc acg gtc 288
 Arg Met Ala Phe Val Thr Ser Ser Ala Ala Ala Ser Val Leu Thr Val
 85 90 95

atg ctg att gcc ttt gac agg tac ctg gcc att aag cag ccc ctc cgt 336
 Met Leu Ile Ala Phe Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Lys Gln Pro Leu Arg
 100 105 110

tac ttc cag atc atg aat ggg ctt gta gcc gga gga tgc att gca ggg 384
 Tyr Phe Gln Ile Met Asn Gly Leu Val Ala Gly Gly Cys Ile Ala Gly
 115 120 125

ctg tgg ttg ata tct tac ctt atc ggc ttc ctc cca ctt gga gtc tcc 432
 Leu Trp Leu Ile Ser Tyr Leu Ile Gly Phe Leu Pro Leu Gly Val Ser
 130 135 140

ata ttc cag cag acc acc tac cat ggg ccc tgc acc ttc ttt gct gtg 480
 Ile Phe Gln Gln Thr Thr Tyr His Gly Pro Cys Thr Phe Phe Ala Val
 145 150 155 160

ttt cac cca agg ttt gtg ctg acc ctc tcc tgt gct ggc ttc ttc cca 528
 Phe His Pro Arg Phe Val Leu Thr Leu Ser Cys Ala Gly Phe Phe Pro
 165 170 175

gct gtg ctc ctc ttt gtc ttc ttc tac tgt gac atg ctc aag att gcc 576
 Ala Val Leu Leu Phe Val Phe Phe Tyr Cys Asp Met Leu Lys Ile Ala

180	185	190	
tct gtg cac agc cag cac atc cgg aag atg gaa cat gca gga gcc atg	624		
Ser Val His Ser Gln His Ile Arg Lys Met Glu His Ala Gly Ala Met			
195	200	205	
gtt gga gct tgc cgg ccc cca cgg cct gtc aat gac ttc aag gct gtc	672		
Val Gly Ala Cys Arg Pro Pro Arg Pro Val Asn Asp Phe Lys Ala Val			
210	215	220	
cgg act gta tct gtc ctt att ggg agc ttc acc ctg tcc tgg tct ccg	720		
Arg Thr Val Ser Val Leu Ile Gly Ser Phe Thr Leu Ser Trp Ser Pro			
225	230	235	240
ttt ctc atc act agc att gtg cag gtg gcc tgc cac aaa tgc tgc ctc	768		
Phe Leu Ile Thr Ser Ile Val Gln Val Ala Cys His Lys Cys Cys Leu			
245	250	255	
tac caa gtg ctg gaa aaa tac ctc tgg ctc ctt gga gtt ggc aac tcc	816		
Tyr Gln Val Leu Glu Lys Tyr Leu Trp Leu Leu Gly Val Gly Asn Ser			
260	265	270	
ctg ctc aac cca ctc atc tat gcc tat tgg cag agg gag gtt cgg cag	864		
Leu Leu Asn Pro Leu Ile Tyr Ala Tyr Trp Gln Arg Glu Val Arg Gln			
275	280	285	
cag ctc tgc cac atg gcc ctg ggg gtg aag aag ttc ttt act tca atc	912		
Gln Leu Cys His Met Ala Leu Gly Val Lys Lys Phe Phe Thr Ser Ile			
290	295	300	

ttc ctc ctt ctc tcg gcc agg aat cgt ggt cca cag agg acc cga gaa 960

Phe Leu Leu Leu Ser Ala Arg Asn Arg Gly Pro Gln Arg Thr Arg Glu

305 310 315 320

agc tcc tat cac atc gtc act atc agc cag ccg gag ctc gat ggc tag 1008

Ser Ser Tyr His Ile Val Thr Ile Ser Gln Pro Glu Leu Asp Gly

325 330 335

<210> 4

<211> 335

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<400> 4

Met Glu Ser Ser Phe Ser Phe Gly Val Ile Leu Ala Val Leu Thr Ile

1 5 10 15

Leu Ile Ile Ala Val Asn Ala Leu Val Val Val Ala Met Leu Leu Ser

20 25 30

Ile Tyr Lys Asn Asp Gly Val Gly Leu Cys Phe Thr Leu Asn Leu Ala

35 40 45

Val Ala Asp Thr Leu Ile Gly Val Ala Ile Ser Gly Leu Val Thr Asp

50 55 60

Gln Leu Ser Ser Ser Ala Gln His Thr Gln Lys Thr Leu Cys Ser Leu

65 70 75 80

Arg Met Ala Phe Val Thr Ser Ser Ala Ala Ala Ser Val Leu Thr Val

85 90 95

Met Leu Ile Ala Phe Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Lys Gln Pro Leu Arg

100 105 110
Tyr Phe Gln Ile Met Asn Gly Leu Val Ala Gly Gly Cys Ile Ala Gly
115 120 125
Leu Trp Leu Ile Ser Tyr Leu Ile Gly Phe Leu Pro Leu Gly Val Ser
130 135 140
Ile Phe Gln Gln Thr Thr Tyr His Gly Pro Cys Thr Phe Phe Ala Val
145 150 155 160
Phe His Pro Arg Phe Val Leu Thr Leu Ser Cys Ala Gly Phe Phe Pro
165 170 175
Ala Val Leu Leu Phe Val Phe Phe Tyr Cys Asp Met Leu Lys Ile Ala
180 185 190
Ser Val His Ser Gln His Ile Arg Lys Met Glu His Ala Gly Ala Met
195 200 205
Val Gly Ala Cys Arg Pro Pro Arg Pro Val Asn Asp Phe Lys Ala Val
210 215 220
Arg Thr Val Ser Val Leu Ile Gly Ser Phe Thr Leu Ser Trp Ser Pro
225 230 235 240
Phe Leu Ile Thr Ser Ile Val Gln Val Ala Cys His Lys Cys Cys Leu
245 250 255
Tyr Gln Val Leu Glu Lys Tyr Leu Trp Leu Leu Gly Val Gly Asn Ser
260 265 270
Leu Leu Asn Pro Leu Ile Tyr Ala Tyr Trp Gln Arg Glu Val Arg Gln
275 280 285
Gln Leu Cys His Met Ala Leu Gly Val Lys Lys Phe Phe Thr Ser Ile
290 295 300
Phe Leu Leu Leu Ser Ala Arg Asn Arg Gly Pro Gln Arg Thr Arg Glu
305 310 315 320
Ser Ser Tyr His Ile Val Thr Ile Ser Gln Pro Glu Leu Asp Gly
325 330 335

<210> 5

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized
primer sequence

<400> 5

aaaagcttcc tgcagcctcc agctctcc

28

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized
primer sequence

<400> 6

aaccatggcc tcttctgatg cagc

24

<210> 7

<211> 377

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

```
cctgcagcct ccagctctcc tggctctaatg tggaaagtgg cccaggtgag ggctttgctc      60
tcctggagac atttgcccc agctgtgagc agggacaggt ctggccaccg ggccccctggt      120
taagactcta atgaccgcgt ggtcctgagg aagaggtgct gacgaccaag gagatcttcc      180
cacagacca gcaccaggga aatgggtccgg aaattgcagc ctcagcccc agccatctgc      240
cgaccccccc accccaggcc ctaatgggcc aggcggcagg ggttgacagg taggggagat      300
gggctctgag actataaagc cagcgggggc ccagcagccc tcagccctcc aggacaggct      360
gcatcagaag aggccat                                     377
```

【図面の簡単な説明】

【図 1】

プラスミド I n s P r o と一緒に、プラスミド p E F - B O S S S F - N A 又はコントロールベクター（プラスミド p E F - B O S）を遺伝子導入されたマウス膵β細胞株 N I T 1 細胞における、ルシフェラーゼ活性を示すグラフである。

【図 2】

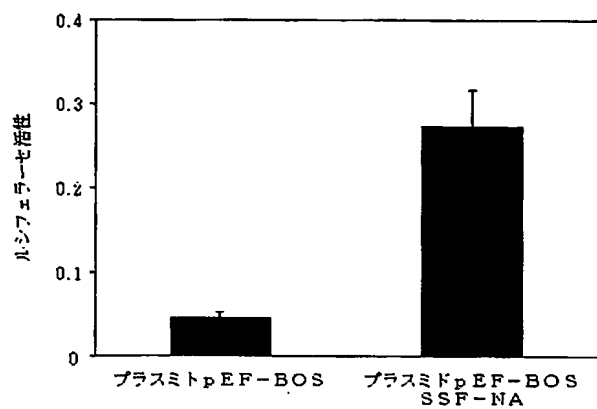
プラスミド I n s P r o を遺伝子導入したマウス膵β細胞株 N I T 1 細胞を、2

ー (ピリジン-4-イル) エチル チオベンゾエート (LT-1 Z 0059
519) 処理し、ルシフェラーゼ活性を測定した結果を示すグラフである。

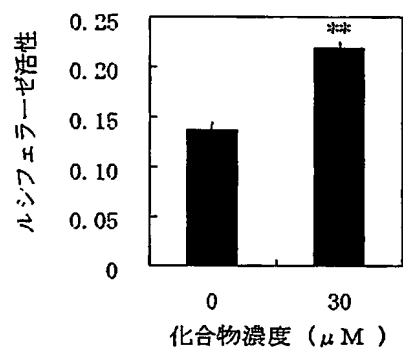
【書類名】

図面

【図 1】



【図 2】



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 インスリン含量を増加させ、糖尿病を予防及び／又は治療するために有用な物質のスクリーニングに役立つツール、スクリーニング法及び新規なインスリン含量増加剤を提供する。

【解決手段】 インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤スクリーニングツールは、活性化されることにより、インスリン産生を促進する活性を示すGタンパク質共役型受容体であるか、あるいは、前記ポリペプチドを発現している細胞である。インスリン産生促進剤及び／又はインスリン含量増加剤スクリーニング方法は、前記細胞、又はその細胞膜と、試験化合物とを接触させる工程、及び前記ポリペプチドが活性化されるか否かを分析する工程を含む。

【選択図】 なし

特願 2003-056813

出願人履歴情報

識別番号

[000006677]

1. 変更年月日

1990年 8月10日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都中央区日本橋本町2丁目3番11号

氏 名

山之内製薬株式会社